

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15722

研究課題名（和文）ノンコーディングRNAエレノアによるRNAクラウドを介した転写活性化機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of transcriptional activation via RNA Cloud formed by ELEANOR noncoding RNAs

研究代表者

市川 雄一（ICHIKAWA, Yuichi）

公益財団法人がん研究会・がん研究所 がん生物部・研究員

研究者番号：20632160

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ノンコーディングRNAエレノアは、RNAクラウドを形成しエストロゲン受容体（ER）をコードするESR1遺伝子の転写を活性化することで、ER陽性乳がんの再発に関与すると示唆されている。本研究では、エレノアがESR1遺伝子座近傍のスーパーエンハンサーに集積し、BRD4のリクルートを促進することを明らかにした。また、BRD4はエレノアの転写およびER陽性乳がんの増殖に必要であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エレノアRNAは細胞のがん化や乳がんの治療耐性化との関与が示唆されている。したがって、本研究によって得られた成果は、がん細胞が治療抵抗性を獲得するメカニズムの一端を明らかにするものであり、再発がんの診断あるいは新たな治療標的の同定につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：ELEANORS, a cluster of long noncoding RNAs, are thought to be involved in the recurrence of ER-positive breast cancer by forming an RNA cloud and activating transcription of the ESR1 gene, which encodes the estrogen receptor (ER). In this study, we have revealed that ELEANORS are associated with super-enhancer near the ESR1 gene and promote BRD4 recruitment. We have also showed that BRD4 is required for transcription of the ELEANORS and growth of ER-positive breast cancer cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：エピジェネティクス クロマチン ノンコーディングRNA ER陽性乳がん スーパーエンハンサー

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

約70%の乳がんはエストロゲン受容体(ER)を高発現しており、その増殖に女性ホルモンであるエストロゲンを必要とする。そのため、エストロゲン作用を標的とした内分泌療法が有効である。一方で、長期治療の過程でがん細胞が薬剤耐性を獲得し、再発することが問題である。このような再発乳がんでは、ERが過剰発現していることが報告されている。しかし、治療耐性獲得の過程で何がきっかけとなり、ERの過剰発現を誘導するのか、その詳しい仕組みは分かっていなかった。申請者らの研究グループは、乳がん患者の組織細胞や、治療耐性を持つ再発乳がんのモデル細胞株であるLTED(Long Term Estrogen Deprivation)細胞を用いた解析から、再発乳がん細胞において高発現している核内長鎖ノンコーディングRNA「エレノア」を発見した(Tomita *et al. Nature Commun.* 2015)。

再発乳がん細胞では、エレノアがERをコードする*ESR1*遺伝子座とその上流から転写され、細胞核内で集積し大きな塊(RNAクラウド)を形成する(図1A)。興味深いことに、エレノアRNAをsiRNAにより減弱し、RNAクラウドを破壊すると、下流に存在する*ESR1*遺伝子の転写量が減少した。

これらの結果から、エレノアは転写活性化に寄与するノンコーディングRNAであると示唆されるが、そのメカニズムやRNAクラウドを形成する分子機構は不明であった。したがって、RNAクラウド形成を介した遺伝子発現制御機構の解明が、本研究課題の核心をなす問いである。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、再発乳がんを高発現しているエレノアRNAをモデル系として、RNAクラウドを介した転写活性化機構を解明することである。先行研究から、エレノアRNAが*ESR1*遺伝子座近傍のクロマチンを取り囲むことで転写活性化に寄与すると考えられる(図1B)。しかし、RNAクラウドを形成する分子メカニズムや、なぜRNAクラウドに取り囲まれた遺伝子座が転写活性化するのか等、その詳細は全く明らかになっていない。核内長鎖ノンコーディングRNAを介した転写活性化は、乳がん以外のがんや、環境変化に適応する過程の細胞にも共通する普遍的な現象であると予想される。実際に、エレノア以外にもがん関連遺伝子の発現を抑制または活性化するノンコーディングRNAが多数報告されている(Chiu *et al. Cell Rep.* 2018)。しかし、その詳しい作用機序は明らかになっていない。したがって、本研究により理解されるメカニズムは、ノンコーディングRNAによる転写制御の分子基盤の解明や、がんなどの分子病態の理解につながる。

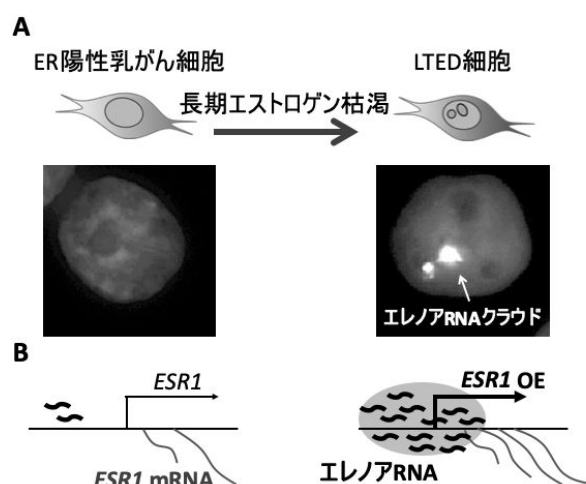


図1 エレノアはRNAクラウドを形成し*ESR1*遺伝子座の転写を活性化する

- (A) LTED細胞では核内にエレノアRNAクラウドが観察される(RNA-FISH画像)
- (B) エレノアは*ESR1*遺伝子座を取り囲む

### 3. 研究の方法

#### (1) エレノア RNA と相互作用するゲノム領域の解析

エレノア RNA 特異的なビオチン化オリゴ DNA プローブを用いた RNA プルダウン法 (ChIRP 法) を施行し、エレノア RNA と共沈降したゲノム DNA について解析を行った。データベース検索等から、エレノアと共通した領域に結合するタンパク質を同定した。

#### (2) RNA クラウドの形成に関与するエレノア RNA 結合タンパク質の解析

方法 1 で同定した因子について、エレノアノックダウン条件下で ChIP-seq 法によるゲノムワイド相互作用解析を行った。また、RIP-qPCR による RNA-タンパク質相互作用解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) エレノア RNA が結合するゲノム領域を特定するために、ChIRP-seq 法によるゲノムワイド相互作用解析を行った。その結果、エレノア RNA は *ESR1* 遺伝子座上流のクロマチン領域と相互作用する事が分かった。この領域は、活性化マークであるヒストン H3K27ac や、転写調節因子である BRD4 がエンリッチしており、ER 陽性乳がん細胞においてスーパーエンハンサーとして機能していることが示唆された。

(2) エレノア RNA と BRD4 の機能に関連があると考えられたため、エレノア RNA をノックダウンし、BRD4 結合領域を ChIP-seq 法を用いて解析した。その結果、エレノア RNA ノックダウン条件下では、スーパーエンハンサーへの BRD4 の集積が顕著に減少することが明らかになった。また、BRD4 抗体を用いた RIP-qPCR 法により、エレノア RNA と BRD4 の結合が示唆された。さらに、エレノアを高発現している乳がん細胞を BRD4 阻害薬で処理すると、エレノアの発現およびがん細胞の増殖が抑えられた。これらの結果から、エレノア RNA は BRD4 とスーパーエンハンサーの相互作用を活性化すること、BRD4 はエレノアを高発現する乳がん細胞の増殖に必要なことが分かった。本研究で得られた成果は、がんの診断、あるいは BRD4 を標的とした新たな治療戦略につながると期待される。

#### < 引用文献 >

1. Tomita S. *et al.* A cluster of noncoding RNAs activates the *ESR1* locus during breast cancer adaptation. *Nat Commun.* 6: 6966 (2015) doi: 10.1038/ncomms7966.
2. Chiu HS *et al.* Pan-Cancer Analysis of lncRNA Regulation Supports Their Targeting of Cancer Genes in Each Tumor Context. 23:297-312.e12. *Cell Rep.* (2018) doi: 10.1016/j.celrep.2018.03.064.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fukuoka Megumi, Ichikawa Yuichi, Osako Tomo, Fujita Tomoko, Baba Satoko, Takeuchi Kengo, Tsunoda Nobuyuki, Ebata Tomoki, Ueno Takayuki, Ohno Shinji, Saitoh Noriko	4. 巻 -
2. 論文標題 The ELEANOR non coding RNA expression contributes to cancer dormancy and predicts late recurrence of ER positive breast cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15373	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ichikawa Yuichi, Saitoh Noriko	4. 巻 -
2. 論文標題 Shaping of genome by long noncoding RNAs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cytogenomics	6. 最初と最後の頁 357 ~ 372
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/B978-0-12-823579-9.00018-7	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 市川雄一、斉藤典子
2. 発表標題 Discovery of novel RNA clouds in ER-positive breast cancer cells
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 市川雄一、斉藤典子
2. 発表標題 ELEANOR-chromatin interaction facilitates ESR1 transcription: 非コード RNAエレノアとクロマチンの相互作用を介したESR1遺伝子の転写活性化
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 市川雄一、斉藤典子
2. 発表標題 ER陽性乳がん細胞で発現する長鎖非コードRNA ELEANOR2はRNAクラウドを形成し転写を促進する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関